

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

See included English Abstracts
and 2 sec. search reports

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-121870

(43) 公開日 平成9年(1997)5月13日

(51) IntCl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/19			1/19	
1/21			1/21	
9/50			9/50	

// (C 1 2 N 1/19

審査請求 未請求 請求項の数18 F D (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-353931

(22) 出願日 平成7年(1995)12月28日

(31) 優先権主張番号 特願平6-340399

(32) 優先日 平6(1994)12月29日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平7-245279

(32) 優先日 平7(1995)8月30日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 河合 美佐子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味

の素株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 浅野 皆夫

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味

の素株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 鈴木 俊一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味

の素株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 洋子 (外2名)

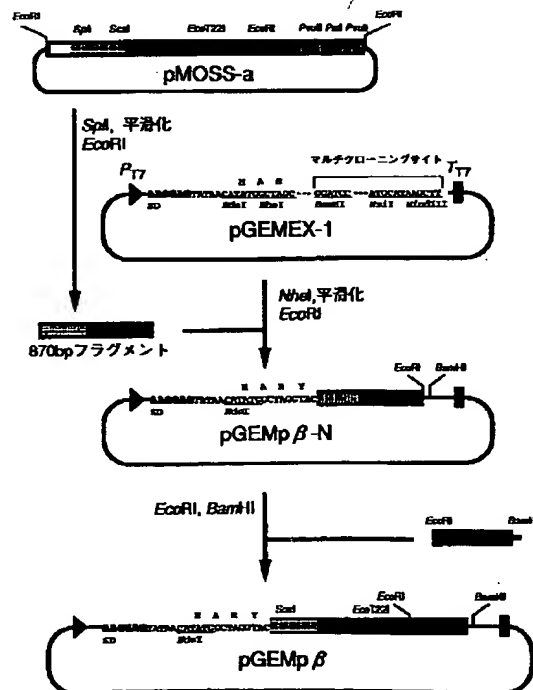
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規チオールプロテアーゼをコードするDNAおよびこれを用いた該チオールプロテアーゼの製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 発芽ダイズ子葉に由来する新規チオールプロテアーゼをコードするcDNA、該DNAを含有する組換え発現ベクター、該組換え発現ベクターによって形質転換された大腸菌、酵母である形質転換体並びに該形質転換体を用いたチオールプロテアーゼの製造方法。

【効果】 ダイズタンパク質を効率よくアミノ酸または低分子ペプチドにまで分解し得る新規チオールプロテアーゼを、遺伝子組換え手法により直接的にしかも高効率で大量に生産することが可能となる。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1または2に示す塩基配列で表される、発芽ダイズ子葉に由来する新規チオールプロテアーゼをコードするDNA。

【請求項2】 配列表の配列番号1または2におけるアミノ酸配列またはこの配列において1若しくは複数のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、発芽ダイズ子葉に由来する天然型チオールプロテアーゼの活性特性を発揮し得るチオールプロテアーゼをコードするDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号3に示す塩基配列またはその部分配列で表されるDNAであって、該配列番号3におけるアミノ酸配列またはこの配列において1若しくは複数のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、発芽ダイズ子葉に由来する天然型チオールプロテアーゼの活性特性を発揮し得るチオールプロテアーゼをコードする、上記DNA。

【請求項4】 配列表の配列番号3のアミノ酸番号4位(Tyr)～351位(Val)までのアミノ酸配列をコードする、請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 配列表の配列番号3の塩基番号10～1053の塩基配列で表される、請求項3または4に記載のDNA。

【請求項6】 配列表の配列番号3のアミノ酸番号111位(Asp)～351位(Val)までのアミノ酸配列をコードする、請求項3に記載のDNA。

【請求項7】 配列表の配列番号3の塩基番号331～1053の塩基配列で表される、請求項3または6に記載のDNA。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか1項に記載のDNAを含有する、組換え発現ベクター。

【請求項9】 請求項8に記載の組換え発現ベクターで形質転換された大腸菌(*Escherichia coli*)である、形質転換体。

【請求項10】 請求項9に記載の形質転換体を培養し、培養物中に産生されたチオールプロテアーゼを単離し、所望により精製することからなる、チオールプロテアーゼの製造方法。

【請求項11】 前記培養物中に産生されたチオールプロテアーゼをタンパク質封入体として回収し、可溶化・巻き戻した後にpHを酸性側にシフトして活性化することからなる、請求項10に記載のチオールプロテアーゼの製造方法。

【請求項12】 請求項4または5に記載のDNAの5'末端側にシグナル配列をコードするDNAを付加したDNA。

【請求項13】 前記シグナル配列が、配列表の配列番号2の塩基番号48～122の塩基配列である、請求項12に記載のDNA。

【請求項14】 配列表の配列番号2のアミノ酸番号-

132位(Met)～241位(Val)までのアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項15】 配列表の配列番号2の塩基番号48～1166の塩基配列で表されるDNA。

【請求項16】 請求項12～15のいずれか1項に記載のDNAを含有する、組換え発現ベクター。

【請求項17】 請求項16に記載の組換え発現ベクターで形質転換された酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)である、形質転換体。

10 【請求項18】 請求項17に記載の形質転換体を培養し、培地中に産生されたチオールプロテアーゼを単離し、所望により精製することからなる、チオールプロテアーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、従来のプロテアーゼでは分解の難しいダイズ種子貯蔵タンパク質を容易に分解し得る新規なチオールプロテアーゼをコードするDNA、該DNAを含有する組換え発現ベクター、該組換え発現ベクターにより形質転換された形質転換体並びに該形質転換体を用いたチオールプロテアーゼの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ダイズタンパク質のアミノ酸への分解は、塩酸等の酸による加水分解、あるいは麹菌等の微生物酵素をはじめとする既存のプロテアーゼによる分解などにより行われている。

【0003】しかしながら、酸による加水分解を行った場合、天然調味料になり得るようなダイズタンパク質加水分解産物を得ようとする、100℃で1～2日間の反応が必要となり、このような高温、長時間の反応はエネルギー消費量が大いという問題がある。さらに、酸によるタンパク質の加水分解法は簡便である一方、アミノ酸の過剰分解(破壊)、中和のために高塩分となるなどの問題もある。

【0004】そこで上記問題を解決すべく、既存のプロテアーゼによる穏和な条件下でのタンパク質分解が提案され、特に、タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)によるダイズタンパク質のアミノ酸への分解は、生物反応を利用する穏やかな反応条件で進行するため、化学反応を利用する酸加水分解に代わる方法として実現が期待されている。

【0005】しかしながら、一般にマメ科植物の貯蔵タンパク質は、未変性の状態では既存のプロテアーゼに対してかなりの耐性を有することが知られており(S. S. Nielsen et al., "J. Agric. Food Chem.", 36, 896(1988))、これらを酵素的に完全分解に至らしめるには厳密な条件下での変性処理が必要とされ、そのうえ、反応には長時間を要する。この長時間の反応は、反応基質の完全な滅菌が困難なものと相まって、反応中の雑菌汚染

30

40

50

の原因となる。そのため、常に高濃度の塩や酢酸等の添加が必要になるという問題がある。

【0006】そのためダイズタンパク質を変性処理の有無にかかわらず短時間で容易にアミノ酸または低分子ペプチドにまで分解し、また、雑菌の混入しにくい酸性やアルカリ性域でも反応し得るような酵素の発見が望まれていた。

【0007】本発明者らは、このような期待に応え得るプロテアーゼを発芽ダイズ子葉より見出し、単離精製を行い、諸性質を調べ、そのN末端付近のアミノ酸配列を決定し、さらに酵素活性を確認し、従前に出願を行っている（特願平6-294548号明細書）。すなわち、当該プロテアーゼはプロテアーゼD3とも名付けられた新規チオールプロテアーゼであり、分子量はSDS-PAGEで26~30kDa、反応至適pH約3~7、至適温度30~50℃で、ウシ血清アルブミンのみならず、ダイズタンパク質であるグリシニン（11Sグロブリン）、 β -コングリン（7Sグロブリン）を未変性状態でアミノ酸、あるいはオリゴペプチドまできわめて強力に分解し得る特異な酵素であり、その産業上での利用が大いに期待される。

【0008】しかしながら、この新規チオールプロテアーゼの発芽ダイズ子葉中での含量は微量であるため、当該酵素を発芽ダイズ子葉抽出物より大量に調製することには相当な困難があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上述の問題点を解決する方法の1つとしては、該新規チオールプロテアーゼ遺伝子をダイズ以外の系で遺伝子組換え技術を用いて大量発現させることにより、大量のチオールプロテアーゼを取得するという方法が挙げられる。この方法を実現するためには、まず、当該新規チオールプロテアーゼをコードするcDNAを取得し、塩基配列を解析し、該チオールプロテアーゼの全アミノ酸配列に関する情報を得ることが必須である。

【0010】次に、該新規チオールプロテアーゼをコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込み、目的物を大量に生産する形質転換体を得ることが必須である。

【0011】さらに場合によっては、この形質転換体の培養によって得られた該チオールプロテアーゼ遺伝子産物を、活性体へと変換する操作技術も必要であろう。

【0012】本発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、発芽ダイズ子葉に由来する新規チオールプロテアーゼを、天然から単離するという方法に代えて、遺伝子組換え技術を用いて効率的な遺伝子発現並びに該チオールプロテアーゼの大量生産をなし得るための技術を提供することを課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、すでに本発明者らによ

り明らかにされている当該新規チオールプロテアーゼのN末端アミノ酸配列をもとに、発芽ダイズ子葉mRNAより調製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、該チオールプロテアーゼをコードするcDNAを取得した。

【0014】本発明者らはさらに研究を進め、この得られたcDNAを用いて該新規チオールプロテアーゼを生産する形質転換体である大腸菌および酵母を得、これにより該チオールプロテアーゼ活性を有するタンパク質を得るに至った。

【0015】すなわち本発明は、発芽ダイズ子葉に由来する新規チオールプロテアーゼをコードするcDNA、および該cDNAを用いた遺伝子組換え技術による該チオールプロテアーゼの製造方法に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳述する。上述したように、発芽ダイズ子葉に由来する新規チオールプロテアーゼは、本発明者らにより単離に成功し、その特性についても研究されている（特願平6-294548号明細書）。この新規チオールプロテアーゼには2種類のアイソザイムが存在し、いずれも分子量、反応至適pH、至適温度、阻害剤の種類、活性化剤の種類、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸または低分子ペプチドにまで分解するという作用のいずれにおいても著しい一致をみている。したがって、本発明においてはいずれのアイソザイムも本発明でいう新規チオールプロテアーゼに含むものとする。

【0017】なお、上記2種類のアイソザイムを区別するために、便宜上一方をD3- α 、他の一方をD3- β と称する。本発明者らにより既に確認されているD3- α のN末端アミノ酸配列は、Asp-Lys-Leu-Pro-Glu-Ser-Val-Asp-Trp-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Val-Pro-Pro-Val-Lys-Asp-Gln-Gly-Gly-Xaa-Gly-Ser-Xaa-Trp-Ala-Pheであり、D3- β のN末端アミノ酸配列は、Asp-Lys-Leu-Pro-Asp-Ser-Val-Asp-Trp-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Val-Pro-Pro-Val-Lys-Asp-Gln-Gly-Glyである。D3- α 中のXaaは未同定のアミノ酸であるが、これらはCysと推定される。両者のアミノ酸配列は、この範囲では5番目の残基のみが異なっていた（D3- α ではGlu、D3- β ではAsp）。なお、これら新規プロテアーゼのアイソザイムD3- α とD3- β を、D3と総称する。

【0018】本発明のcDNAの取得方法の具体例としては、例えば、D3のN末端のアミノ酸配列をもとにcDNAプローブを作製し、発芽ダイズ子葉から抽出したD3のmRNAを鋳型に作製したcDNAライブラリーからハイブリダイゼーションによりD3のcDNAを釣り上げるなど、従来より慣用的に行われている方法が挙げられる。

【0019】D3のmRNA抽出に用いる発芽ダイズ子葉は、そのダイズの種類を問わない。すなわち市販され

10

20

30

40

50

ているダイズ、搾油原料として用いられているダイズ等、その栽培産地、品種を限定しない。また、発芽の方法、栽培条件、発芽の有無、発芽後の期間を問わないが、ダイズ種子を吸水させ、10日間生長させた発芽ダイズ子葉を用いるのが好ましい。

【0020】また、cDNAプローブは、D3のN末端アミノ酸配列をもとに化学合成してもよく、あるいはPCR法等により作製してもよい。本実施例においてはPCR法により作製したが、その詳細については後述の実施例に詳しく記す。なお、cDNAライブラリーの作製

方法は、常法により行うことができる。
【0021】次に、このようにして得たcDNAを発現ベクターに組み込んで組換え発現ベクターを作製する。用いるベクターは、特に限定されるものではないが、宿主細胞内で自律的に複製可能であって、上記DNAすなわちD3遺伝子を組み込み得る挿入部位をもち、さらにこの組み込んだDNAを宿主細胞内で発現せしめることを可能とする領域を有することが必要である。

【0022】なお、ベクターに組み込むD3遺伝子としては、cDNAだけでなく、cDNA配列から予測されるD3のアミノ酸配列をコードするよう設計して合成されたDNAでもよい。このようなアミノ酸配列をもとにした遺伝子の合成は、DNA自動合成機を利用して合成したオリゴヌクレオチドをアニール後に連結すること等により、容易に行うことができる。

【0023】さらに、D3- α とD3- β 間ではアミノ酸置換がみられても酵素的性質は著しく一致していることから明白なように、一部のアミノ酸残基が置換しても、天然のD3と同じ酵素的性質が得られることが予測される。また、末端の残基が付加または欠失したり、D3とは関連のない配列、例えば発現プラスミド構築の際のリンカーDNAの配列などが付加したりしていても、結果として天然のD3と同じ酵素的性質が得られる可能性もある。このような遺伝子の改変は、市販の遺伝子の部位特異変異導入キットを用いたり、合成遺伝子を挿入することなどにより、容易に実現し得る。したがって、このベクターに組み込むD3遺伝子としては、天然のD3と同じ酵素的性質が維持される限り、その変異体もここでいうD3遺伝子に含む。

【0024】また、D3の生産方法として、異種タンパク質との融合タンパク質として生産させる方法もある。これは例えばpGEXシステム（ファルマシア社製）などを用いればD3をグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として大腸菌で生産させることが可能である。

【0025】そのほかのD3の生産方法として、枯草菌、酵母、麹菌などのタンパク質分泌能を利用して、培地中へ生産させる方法もある。例えば酵母を宿主とした場合、D3自身のシグナル配列や、酵母自身の分泌タンパク質のシグナル配列、たとえば α ファクターなどのシ

グナル配列を用いれば、D3を培地中に分泌生産させることも可能である。

【0026】次いで上記組換え発現ベクターを宿主細胞内に導入し、形質転換体を得る。組換え発現ベクターの宿主細胞内への導入方法は、従来より慣用的に用いられている方法により行うことができる。コンピテントセル法、プロトプラスト法、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リボソーム融合法等、種々のものが挙げられるが、用いる宿主に応じてそれぞれ任意の方法を取り得る。本発明のD3を産生する宿主としては、大腸菌、枯草菌、酵母、麹菌等の微生物のほか、カイコ培養細胞等の細胞を用いてもよい。

【0027】そして、このようにして得られた形質転換体を培養することにより、培養物中にD3を産生させる。これを公知の方法で単離し、場合によっては精製することにより、目的とする酵素が得られる。

【0028】形質転換体を培養するための培地は公知であり、例えば大腸菌ではLB培地などの栄養培地や、M9培地などの最小培地に炭素源、窒素源、ビタミン類などを添加して用いることができ、酵母ではYPDなどの栄養培地や、SD培地などの最小培地に炭素源、窒素源などを添加して用いることができる。形質転換体の培養は、宿主に応じて、通常16～42℃、好ましくは25～37℃で5～168時間、好ましくは8～72時間行う。振盪培養と静置培養のいずれも可能であるが、必要に応じて攪拌や通気を行ってもよい。また、D3遺伝子発現のために誘導型プロモーターを用いた場合は、培地にプロモーター誘導剤を添加して培養を行う。

【0029】D3の単離・精製法としては、形質転換体の抽出物や培地より、公知の塩析、等電点沈澱法、または溶媒沈澱法等の沈澱法、透析、限外濾過またはゲル濾過等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等の疎水度の差を利用する方法等が挙げられ、これらを組み合わせることにより単離・精製が可能である。

【0030】大腸菌等を宿主とした場合には、不活性化D3会合体、すなわちタンパク質封入体としてD3遺伝子産物を得た後、これを適当な方法で活性化するのが好ましい。タンパク質封入体としてD3遺伝子を発現させた場合の利点として、D3遺伝子産物を封入体として簡単に単離できる、D3活性の宿主への影響を軽減できる、等の点が挙げられる。後述の実施例では、大腸菌を宿主として、一部改変したD3遺伝子をタンパク質封入体として高発現させて回収し、可溶化・巻き戻した後にpHを酸性側にシフトして活性化させて本チオールプロテアーゼを得る方法について詳しく述べる。なお、タンパク質封入体を可溶化・巻き戻した後にpHを酸性

側にシフトして活性化させる方法は公知であり、例えばキモシンに関しては "Biotechnology", September 1984, pp.801-804に、カテプシン-Lに関しては "The Journal of Biological Chemistry", vol.264, No.34, pp.20487-20495 (1989) に、それぞれ記載されている。すなわち、キモシン、カテプシン-Lは、pHを酸性にシフトさせることにより、成熟型酵素のN末端側にある配列を、酸性で機能するプロテアーゼによる消化や、自己消化により除去している。しかしながら、本チオールプロテアーゼD3に関しては、cDNA構造よりそのC末端側にも天然型D3にはない配列の存在が示唆された。そのため、あらかじめこのC末端側の配列を除いた形でD3を発現させ、その封入体について、可溶化・巻戻しを行った後にpHを酸性側にシフトさせて活性化を行った。

【0031】酵母や細菌等、タンパク質分泌能を有する宿主を用いた場合には、D3を培地に分泌生産させると、D3の折り畳みが正常に行われるためD3活性体を得られるため、D3活性の宿主への影響が軽減でき、さらに精製が簡便になる等の利点がある。後述の実施例では、酵母を宿主として、一部改変したD3遺伝子を用いてD3を分泌発現させることにより、本チオールプロテアーゼを得る方法について詳しく述べる。

【0032】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて説明する。

【0033】[実施例1 PCR法によるチオールプロテアーゼD3のN末端アミノ酸をコードする部分cDNA断片のクローニング] cDNAライブラリーのスクリーニングのためのプローブに用いるために、プロテアーゼD3のN末端部分をコードする部分cDNA断片を下記に示すようにPCR法により増幅後、クローニングした。

【0034】まず、播種後10日目のダイズ子葉を用いて、常法により、RNA エクストラクション キット (RNA Extraction Kit; ファルマシア社製) によりRNAを抽出し、mRNA 精製キット (mRNA Purification Kit; ファルマシア社製) を用いて、poly (A) RNAを精製した。

【0035】このようにして得たpoly (A) RNAを鋳型にして、いわゆるRT-PCR反応 (reverse transcript polymerase chain reaction) を行ったのであるが、このときに用いたPCRプライマーは次のようなものであった。すなわち、本発明者らによりすでに決定されている上記D3- α のN末端配列中、1番目のAspから5番目のGluまでの配列に基づいて、5'-GA(C/T)AA(A/G)TT(A/G)CC(A/G/C/T)GA-3' なる縮重したオリゴヌクレオチドを合成し、これをセンス鎖のPCRプライマーとした。

【0036】また、26番目のSerから30番目のPheまでの配列 (未同定のアミノ酸は他のチオールプロ

テアーゼとの比較よりCysと推定した) に基づいて、5'-AA(A/G/C/T)GCCCCA(C/T)CA(C/T)CT-3' なる同様に縮重したオリゴヌクレオチドを合成し、これをアンチセンス鎖のPCRプライマーとした。

【0037】次に、これらのpoly (A) RNA、PCRプライマーを用いて、RT-PCR反応を行った。具体的には、poly (A) RNA 20ngを鋳型として、RNA-PCR キット (パーキン・エルマー・シータス社製) を用いてoligo (dT) プライマーにより最初の1本鎖cDNAを合成した後、上記センス鎖プライマーおよびアンチセンス鎖プライマーをそれぞれ1 μ M存在下、DNA サーマル サイ클アー (パーキン・エルマー・シータス社製) を用いて以下の温度条件でPCR反応を行った。

【0038】すなわち、94℃、5分間の熱変性の後、37℃、2分間のアニーリングを行い、続いて、1分30秒間の勾配を掛けて72℃まで温度上昇させた後、さらに1分30秒間の伸長反応を行った。この後、94℃、1分間の熱変性、37℃、2分間のアニーリング、1分30秒間の勾配を掛けた72℃までの温度上昇、72℃、1分30秒間の伸長反応からなるサイクルを35サイクル繰返し、その後、72℃、7分間の伸長反応を行って反応を停止した。

【0039】この結果、約90bpの増幅断片が得られたので、これを、TA クローニング キット (インビトロゲン社製) によりプラスミドベクター (PCR2) にクローニングし、その塩基配列をALF DNA シークエンサー (ファルマシア社製) により決定した。

【0040】その結果、得られた塩基配列のコードするアミノ酸配列は、決定されたチオールプロテアーゼD3- α のN末端配列と完全に一致した。

【0041】[実施例2 チオールプロテアーゼD3 cDNAのクローニング] 実施例1で得られた部分cDNA断片をプローブにしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、チオールプロテアーゼD3のcDNAのほぼ全長を下記の方法によりクローニングした。

【0042】すなわち、実施例1での方法と同様にして得た発芽10日目のダイズ子葉から抽出したpoly (A) RNA 5 μ gから、タイムセーバー cDNA クローニング キット (アマーシャム社製) を用いて2本鎖cDNAを合成し、これをcDNAラビッドクローニング システム (アマーシャム社製) を用いて、常法により、 λ MOSS10xベクターにクローニングし、cDNAライブラリーを得た。

【0043】このcDNAライブラリーの50,000 pfuを実施例1で得た90bpの部分cDNA断片をプローブにして、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング検出システム (アマーシャム社製) を用いて、ブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

【0044】その結果、約50個の陽性クローンを得た。この中より20個をランダムにピックアップし、ブランクを純化した後、cDNAをλMOSS10xベクターのもつ自動切り出し機能を利用して、プラスミドの形で回収した。

【0045】これらのプラスミドを単離し、90bp断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション分析を行い、プローブとハイブリダイズするcDNAインサートをもつクローンをさらにピックアップした。

【0046】得られたクローンのcDNAインサートを制限酵素EcoRI、BglII、PstIにより切断し、その切断パターンをアガロースゲル電気泳動により分析したところ、2種類のパターンに分れ、大部分のクローンはこのいずれか一方のパターンのグループに属していた。それぞれのグループから最大のcDNAインサートをもつクローンpMOSS-α(cDNAの長さは約1.9kbp)およびpMOSS-r(cDNAの長さは約1.8kbp)を選んで、その塩基配列を分析した結果、pMOSS-αにはチオールプロテアーゼD3-βのN末端アミノ酸配列をコードする部分が含まれており、pMOSS-rにはチオールプロテアーゼD3-αのN末端アミノ酸配列をコードする部分が含まれていることが明らかになった。

【0047】なお、D3-α cDNAは、pUC18プラスミドベクターに組み込まれた形で大腸菌(Escherichia coli) HB101に形質転換され、かかるプラスミド保持菌は、Escherichia coli AJ13067として、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成6年12月6日に寄託されている(受託番号:FERM P-14688)。

【0048】また、D3-β cDNAは、pUC18プラスミドベクターに組み込まれた形で大腸菌(Escherichia coli) HB101に形質転換され、かかるプラスミド保持菌は、Escherichia coli AJ13066として、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成6年12月6日に寄託されている(受託番号:FERM P-14687)。

【0049】これらのcDNAの全塩基配列を決定した。その結果、チオールプロテアーゼD3-αのcDNAの塩基配列は配列表の配列番号1に、チオールプロテアーゼD3-βのcDNAの塩基配列は配列表の配列番号2に記載した通りであった。

【0050】また、決定したN末端アミノ酸配列を含むフレームで上記塩基配列を翻訳して得られるアミノ酸配列は、配列番号1、2に示したとおりであった。

【0051】[実施例3 D3-βの大腸菌での生産] 実施例2で得られたD3-β cDNAの一部を大腸菌で機能する発現ベクターに組み込み、この発現プラスミドを保持する形質転換体を培養し、遺伝子産物をタンパク質封入体として得た。この封入体を菌体から取り出

し、in vitro で可溶化・巻き戻しを行った後、pHを酸性側にシフトさせると、初めてD3活性を得た。

【0052】大腸菌で生化学的に不活性なタンパク質封入体としてD3遺伝子を発現させると、D3遺伝子産物を封入体として簡単に単離でき、またD3活性の宿主菌体への影響を軽減できるなどの利点がある。

【0053】このときベクターに組み込んだcDNAは、配列表の配列番号3のアミノ酸配列番号4~351位をコードする部分(すなわち塩基番号10~1053部分)である。これは、配列番号2に示されるアミノ酸配列番号107~241位をコードする部分(すなわち塩基番号123~1166部分)にあたる。すなわちこれは、D3-β cDNAの塩基配列より推定される全一次構造から、N末端側のアミノ酸配列番号132位のMet~108位のSer部分、およびC末端側のアミノ酸配列番号242位のCys~332位のAla部分を除いたものである。

【0054】D3-βのこの部分配列を発現させるよう選択したのは、次の理由による。N末端については、プロテアーゼの成熟体のN末端側に存在する配列、いわゆるプロ配列が折り畳みおよび活性制御に関与することが知られており、D3-βではこのプロ配列は配列表の配列番号2のアミノ酸配列番号107位近傍から1位部分であると考えられたからである。

【0055】また、C末端については、ペプチドマッピングにより、C末端の位置にはヘテロジェニティがあり、配列表の配列番号2のアミノ酸配列番号228位のPro~247位のSerであることが判明した。しかし、他のチオールプロテアーゼにはD3-βのC末端側のアミノ酸配列番号242位のCys近傍~332位のAla部分に相当する配列が存在しないこと、D3の分子量は26~30kDaであること、他のチオールプロテアーゼとの比較から242位のCysは活性への関与もS-S結合への関与もないと推測されること、242位のCysコドン(TGT)は1塩基置換により終止コドンになり得ること、等から、上述のようにC末端の位置を241位のValとした。

【0056】また、D3-αとD3-βの酵素化学的性質はほとんど一致しており、実施例2で既述したようにcDNA構造から両者のアミノ酸配列もほとんど一致していると考えられる。したがって、D3-αも本実施例で述べるD3-βの生産方法と同様な方法で生産することが可能であることが容易に推察できる。

【0057】以下に大腸菌を用いた本実施例について、<1>発現プラスミドの構築、<2>該発現プラスミドを用いた大腸菌の形質転換体の作製と培養、<3>タンパク質封入体の単離、可溶化・巻き戻し、<4>自己触媒の活性化について分説する。

【0058】<1>発現プラスミドの構築
図1に示すように、実施例2に記載のD3-β cDN

11

Aを組み込んだpMOSS-aを制限酵素Spl Iで切断し、Klenow酵素で平滑末端化した後、EcoRIで切断して約870bpの断片を得た。この断片を、市販の発現ベクターpGEMEX-1（プロメガ社製）をNhe Iで切断、Klenow酵素で平滑末端化した後にEcoRIで切断した大断片と連結し、プラスミドpGEMpβ-Nを作製した。

【0059】一方、図2に示すように、pMOSS-aをEcoRI、PvuIIで切断して得られた190bpの断片をM13mp19のEcoRI、SmaI間に挿入し、M13β-Cを構築した。そして、M13β-Cの一本鎖DNAを鋳型に、オリゴヌクレオチド 5'-CA AATGCTGAGACAACACT-3' を変異プライマーとして、スカルプター インビトロ ミュータジェネシス システム（アマーシャム社製）を用い、TGT（配列番号2のアミノ酸配列番号242位のCysコドン）をTGA（終止コドン）に部位特異的に変異させ、M13β-C（C242Opal）を作製した。次いでこれをEcoRI、BamHIで切断して約190bpの断片を得た。

【0060】その後、図1に示すように、pGEMpβ-NをEcoRI、BamHIで切断して得られる大断片と、上記M13β-C（C242Opal）からの約190bpの断片とを連結し、発現プラスミドpGEMpβを構築した。すなわちこのpGEMpβに発現するよう組み込んだ配列は配列表の配列番号3に記載したものであり、このなかで塩基番号1～9の配列はベクター由来の塩基配列である。

【0061】以上の変異や構築は、ALF DNA シークエンサー（ファルマシア社製）を用いて塩基配列を分析することにより正しく行われていることを確認した。

【0062】＜2＞発現プラスミドpGEMpβを用いた大腸菌の形質転換体の作製と培養
コンピテントセル法により、上記のpGEMpβを大腸菌JM109（DE3）株（プロメガ社製）に導入した。得られた形質転換体を100μg/mlのアンプシリンを含むM9-カザミノ酸培地で37℃で振盪培養した。培地にイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドを添加して生産誘導すると、目的のD3遺伝子産物は、タンパク質封入体として菌体内に蓄積した。

【0063】＜3＞タンパク質封入体の単離、可溶化・巻き戻し

上述のようにして培養した菌体を集菌後、超音波破碎し、遠心によってタンパク質封入体を回収した。このタンパク質封入体を洗浄後、8M尿素-10mMジチオトレイトール-50mM塩化ナトリウム-50mMトリス・塩酸-5mMエチレンジアミン四酢酸溶液（pH8）に、タンパク質濃度が約10mg/mlになるよう溶解した。これを可溶化pD3-β溶液と呼ぶ。

12

【0064】可溶化pD3-β溶液1容に、還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを含み、タンパク質変性剤を含まない溶液100容をゆっくり添加して、尿素濃度を低下させるとともに、タンパク質濃度も低下させた。この溶液の組成は1mM還元型グルタチオン-0.1～0.5mM酸化型グルタチオン-50mMリン酸カリウム-5mMエチレンジアミン四酢酸溶液（pH10.5）である。

【0065】その後これを約50倍に濃縮し、溶媒を200mM塩化ナトリウム-5mMリン酸カリウム緩衝液（pH10）に置換した。これを巻き戻りpD3-β溶液と呼ぶ。

【0066】＜4＞自己触媒の活性化

巻き戻りpD3-β溶液をpH4前後、200mM塩化ナトリウムに溶液に曝し、30℃でインキュベートさせた。この結果、分子量約41kDaのpD3-βは自己触媒的に分子量約30kDaのD3-βに変換した。このD3-βのc30分解の比活性は15U/mgで、発芽ダイズ子葉より精製した天然型D3-βの約1/5であった。

【0067】なお、このc30分解活性の単位である1Uとは、1μgのc30を1分間に消失させる活性である。本比活性測定は、基質c30の濃度が0.5mg/ml、反応溶液組成が50mM 酢酸ナトリウム（pH4.0）、0.2M NaCl、2mM アジ化ナトリウム、10mM 2-メルカプトエタノールとなるように酵素溶液を添加し、30℃で18時間反応させた反応液の還元SDS-PAGEを行い、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色し、デンストメーターでc30のバンドの減少を定量することにより行った。基質であるc30とは、発芽過程におけるダイズ貯蔵タンパク質7Sグロブリンの分子量30kDaの限定分解フラグメントであり、次のようにして精製した。すなわち発芽7日目のダイズ子葉抽出物から等電点沈澱で夾雑タンパク質を除いたものを、レクチンリガンドアフィニティー担体ConA Sepharose（ファルマシア社製）に供し、吸着画分を溶出させたものである。なお、この活性測定法は、本発明者らにより既に出願されている特願平6-294548号明細書に詳述されている。

【0068】このようにして達成された生産量は、c30分解活性に換算すると、天然型D3として約50mg/1培地であり、これは発芽10日目のダイズ子葉約50kgより精製した量に匹敵する。

【0069】なお、pGEMpβは大腸菌JM109株に形質転換され、その保持菌はEscherichia coli AJ13126として、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成7年7月3日に寄託されている（受託番号：FERM P-15021）。

【0070】〔実施例4 D3-βの酵母での分泌生産〕実施例2で得られたD3-β cDNAの一部を酵

20

30

40

50

母で機能する発現ベクターに組み込み、この発現プラスミドを保持する形質転換体を培養し、培地中にD3活性を検出した。

【0071】このときベクターに組み込んだDNAは、配列表の配列番号2のアミノ酸配列番号-132~241位をコードする部分(すなわち塩基番号48~116部分)に終始コドンTGA(すなわち配列番号3の塩基番号1054~1056部分)を連結したものである。これは、D3-β cDNAの塩基配列より推定される全一時構造から、C末端側のアミノ酸配列番号242位のCys~332位のAla部分を除いたものである。すなわち、D3-βのシグナルペプチドの下流に実施例3で発現させた配列を連結したものであり、該シグナルペプチドは配列表の配列番号2のアミノ酸配列番号-132~-108位をコードする部分(すなわち塩基番号48~122部分)にあたる。

【0072】酵母を用いてD3を培地に分泌生産させると、D3の折り畳みが行われるためD3活性体が得られ、またD3活性の宿主への影響が軽減できる。また、培地中には宿主由来の夾雑タンパク質が少ないため、精製が必要な場合には、操作が簡便になる等の利点がある。

【0073】以下に酵母を用いた本実施例について、＜1＞分泌発現プラスミドの構築、＜2＞該分泌発現プラスミドを用いた酵母の形質転換体の作製、＜3＞形質転換体の培養と活性測定について分説する。

【0074】＜1＞分泌発現プラスミドの構築

図3に示すように、実施例2に記載のD3-β cDNAを組み込んだpUC18-aからcDNA配列を制限酵素KpnI、BamHIで切り出した。まず、この断片を市販の発現ベクターpYES2(インビトロゲン社製)のマルチクローニングサイトのKpnI、BamHI間に挿入し、プラスミドpYESD3(pA)を構築した。

【0075】なお、発現ベクターpYES2は、マルチクローニングサイトの上流にガラクトースで発現誘導されるGAL1プロモーターを、下流にCYC1ターミネーターを有し、マーカーとしてURA3遺伝子を有する。

【0076】次に、図4に示すように、上述のpYESD3(pA)からポリA配列を除くために、D3-β cDNAの3'非翻訳領域のBglIIより3'末端側の配列を除去した。すなわち、pYESD3(pA)のPmaCI、BamHI間に、pYESD3(pA)のPmaCI、BglII断片を挿入し、pYESD3を構築した。このpYESD3は、D3-βの全長、すなわち配列表の配列番号2記載のアミノ酸残基番号-132位のMet~332位のAlaを発現するよう構築されている。

【0077】さらに、配列表の配列番号2記載のアミノ

酸配列番号242位のCys~332位のAla部分を除いたもの、すなわち-132位のMet~241位のVal部分を発現するようなプラスミドを構築した。すなわち、図4に示すように、pYESD3(pA)のPmaCI、BamHI間に、実施例3記載のプラスミドpGEMpβのPmaCI、BamHI断片を挿入し、プラスミドpYESD3(ΔTero)を構築した。

【0078】＜2＞発現プラスミドを用いた酵母の形質転換体の作製

10 酢酸リチウム法に従った、酵母細胞形質転換キットであるイーストメーカー(クロンテック社製)を用いて、上述のプラスミドを、酵母INVSC1株(インビトロゲン社)に導入し、ウラシル非要求性の形質を有する形質転換体を得た。

【0079】＜3＞形質転換体の培養と活性測定

上記の形質転換体、すなわち、ベクターpYES2、pYESD3、pYESD3(ΔTero)をそれぞれ有する酵母INVSC1株を、カゼイン重層寒天培地にて培養し、プロテアーゼ分泌生産の指標となるハローの形成を調べた。

20 【0080】このカゼイン重層寒天培地の組成は、下層はロイシン、ヒスチジン、トリプトファン、および糖源を含むSD寒天培地であり、上層は0.5%(w/v)のカゼインを含む寒天培地である。

【0081】糖源としてガラクトースを添加した場合には、pYESD3(ΔTero)を有する酵母INVS C1株のみが、ハローを形成した。

30 【0082】次に、このpYESD3(ΔTero)形質転換体のハロー形性能が、分泌されたチオールプロテアーゼD3によることの確認を行った。すなわち、上記の形質転換体をガラクトースとカザミノ酸を含むSD培地にて培養し、その培地について、合成ペプチド基質を用いてD3活性を、SDS-PAGEを用いてD3遺伝子産物を検出した。

【0083】D3活性の検出は、発現プラスミドpYESD3(ΔTero)を保持する形質転換体である酵母INVSC1株を培養した培地125μlに、基質としてベンジルオキシカルボニル-Phe-Arg-4-メチルクマリル-7-アミド(以下、Z-FR-MCAと略す)を用い、遊離する7-アミノ-4-メチルクマリル(以下、AMCと略す)の蛍光強度を測定することにより行った。AMCの励起波長は370nm、蛍光波長は460nmである。

40 【0084】このD3活性測定操作は、既知の方法(A. J. Barrett & H. Kirschke, "Methods Enzymol.", 80, 535(1981))により、以下のようにして行った。すなわち、基質濃度が10μM、反応溶液組成が50mM 酢酸ナトリウム(pH4.0)-0.2M NaCl-2mM アジ化ナトリウム-10mM 2-メルカプトエタノールとなるように培地に添加し、37℃で5分間反

応させた後に、阻害剤である（L-3トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル）-L-ロイシン-アグマチン（以下、E-64と略記する）を添加して反応を停止し、AMCの蛍光強度を測定した。対照として、上記基質に阻害剤E-64を加えたものを用い、これと上記飯能液を培地に添加し、同様の操作を行った。

【0085】本チオールプロテアーゼD3が合成ペプチド基質であるZ-FR-MCAをよく分解してAMCを遊離させること、およびE-64によって阻害を受けることは、本発明者らによって確認されている（特願平6-294548号明細書）。

【0086】また、対照としてD3遺伝子をもたないベクターpYES2を保持する形質転換体についても、同様な活性測定操作を行った。

【0087】AMCの蛍光強度の測定結果を表1に示す。なお、この条件において測定した1 μ M AMCの蛍光強度は0.64であった。

【0088】

【表1】

基 質	プラスミドを保持した形質転換体	
	pYES2	pYESD3 (Δ Tero)
+Z-FR-MCA	0.449	0.759
+Z-FR-MCA +E-64	0.446	0.296

表1から明らかなように、pYESD3 (Δ Tero) 形質転換体を培養した培地中には、E-64で阻害される、Z-FR-MCAを分解してAMCを生成させる活性が検出された。pYES2形質転換体を培養した培地中には本活性は検出されなかった。

【0089】また、pYESD3 (Δ Tero) 形質転換体を培養した培地を濃縮してSDS-PAGEに供し銀染色を行った。このSDS-PAGE像を図5に示す。同図中、レーン1は分子量マーカーであり、低分子量からそれぞれ、14.5kDa、21.5kDa、31kDa、45kDa、66kDaである。レーン2および3は、pYES2形質転換体を培養した培地であり、各レーンにはそれぞれ培地8 μ l、約1ml分を添加した。レーン4および5は、pYESD3 (Δ Tero) 形質転換体を培養した培地のそれぞれ8 μ l、約2mlを添加した。

【0090】図5から明らかなように、pYESD3 (Δ Tero) 形質転換体を培養した培地から分子量約40kDaのpD3- β と考えられる幅の広いバンド、および30kDaのD3- β と推定されるバンドが検出された。一方、pYES2形質転換体を培養した培地には、このバンドは検出されなかった。さらに、pYESD3 (Δ Tero) 形質転換体を培養した培地では、培地中の夾雑タンパク質のバンドが消失しているのが観察

された。

【0091】上述の分析結果から、pYESD3 (Δ Tero) 形質転換体のカゼイン重層寒天培地上でのハロ-形成は、本形質転換体がプロ型D3を分泌生産し、これがD3活性体へと変換されることに起因するためと考えられる。

【0092】なお、pYESD3 (Δ Tero) は酵母INVSC1株に形質転換され、その保持菌は*Saccharomyces cerevisiae* AJ14703として、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成7年11月28日に寄託されている（受託番号：FERM P-15310）。

【0093】なお、本発明においては、発現ベクターに組み込まれるD3遺伝子の配列は上記実施例3および4に限られるものではない。すなわち、配列表の配列番号1または2、あるいは3に示す塩基配列またはその部分配列を表すものであって、それらがコードするアミノ酸配列が発芽ダイズ子葉に由来する天然型チオールプロテアーゼの活性特性を発揮し得るチオールプロテアーゼをコードする遺伝子であれば、本発明の範囲内に含まれる。したがって、配列表の配列番号1から3におけるアミノ酸配列またはこの配列において1若しくは複数のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、発芽ダイズ子葉に由来する天然型チオールプロテアーゼの活性特性を発揮し得るチオールプロテアーゼをコードする塩基配列からなる遺伝子も、本発明範囲内に含まれる。

【0094】また、配列表の配列番号3の塩基番号331~1053で表される塩基配列はD3- β 成熟体をコードする遺伝子と考えられることから、これを部分配列として含む塩基配列であって、組み換え遺伝子手法により発芽ダイズ子葉に由来する天然型チオールプロテアーゼと同効の酵素活性を発揮し得るものを生産し得る塩基配列からなる遺伝子もまた、本発明範囲内に含まれる。

【0095】さらに、これらD3遺伝子を発現生産させるための配列、すなわち高発現のための異種融合タンパク質の配列や、分泌発現のためのシグナル配列が付加された配列も、本発明範囲内に含まれる。

【0096】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば、ダイズ貯蔵タンパク質をアミノ酸または低分子ペプチドにまで分解し得る新規チオールプロテアーゼD3のアミノ酸配列をコードするcDNAが得られる。これらcDNAの構造情報をもとに、大腸菌や酵母などで組換え体チオールプロテアーゼを量産できる。また、上記cDNAを用いれば、実施例に詳述した以外の宿主でも、チオールプロテアーゼD3を生産することが可能である。

【0097】

【配列表】

配列番号：1

17

18

配列の長さ: 1807

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

* 生物名: Glycine max

配列の特徴

特徴を表わす記号: CDS

存在位置: 68..1459

特徴を決定した方法: P

*

配列:

TCACCTTCT CCTAAACAT CTCAGTGGG TTCTTCTCT TCTATTACAA	50
CAACGTGTC CAAGACC ATG ACC ATG GCC ATG GCC ACG ATC CTG CTC	97
Met Thr Met Ala Met Ala Thr Ile Leu Leu	
-130 -125	
CTG TTC ACG GTC TTC GCG GTT TCA TCG GCC CTA GAC ATG TCG ATA ATC	145
Leu Phe Thr Val Phe Ala Val Ser Ser Ala Leu Asp Met Ser Ile Ile	
-120 -115 -110	
TCG TAC GAC AAC GCC CAC GCC GCC ACG TCG CGC AGC GAC GAG GAG CTG	193
Ser Tyr Asp Asn Ala His Ala Ala Thr Ser Arg Ser Asp Glu Glu Leu	
-105 -100 -95 -90	
ATG TCC ATG TAC GAG CAG TGG CTG GTG AAG CAC GGC AAG GTG TAC AAC	241
Met Ser Met Tyr Glu Gln Trp Leu Val Lys His Gly Lys Val Tyr Asn	
-85 -80 -75	
GCG CTC GGG GAG AAG GAG AAG AGG TTC CAG ATC TTC AAG GAC AAC CTG	289
Ala Leu Gly Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Ile Phe Lys Asp Asn Leu	
-70 -65 -60	
CGA TTC ATC GAC GAC CAC AAC TCC CAA GAG GAC CGA ACC TAC AAG CTC	337
Arg Phe Ile Asp Asp His Asn Ser Gln Glu Asp Arg Thr Tyr Lys Leu	
-55 -50 -45	
GGA CTG AAC CGG TTC GCG GAT CTC ACC AAC GAG GAG TAC AGG GCC AAG	385
Gly Leu Asn Arg Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ala Lys	
-40 -35 -30	
TAC TTG GGA ACC AAG ATC GAT CCC AAC CGG AGG CTC GGC AAG ACC CCG	433
Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Asp Pro Asn Arg Arg Leu Gly Lys Thr Pro	
-25 -20 -15 -10	
AGC AAC CGA TAC GCG CCA CGT GTC GGC GAC AAA CTA CCT GAA TCG GTT	481
Ser Asn Arg Tyr Ala Pro Arg Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Ser Val	
-5 1 5	
GAT TGG AGG AAG GAA GGT GCT GTT CCT CCA GTC AAA GAC CAA GGA GGC	529
Asp Trp Arg Lys Glu Gly Ala Val Pro Pro Val Lys Asp Gln Gly Gly	
10 15 20	
TGT GGG AGC TGT TGG GCA TTC TCA GCA ATC GGT GCA GTG GAA GGA ATA	577
Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Ile Gly Ala Val Glu Gly Ile	
25 30 35	
AAT AAG ATA GTG ACA GGT GAA CTG ATT TCG TTA TCA GAA CAA GAA TTG	625
Asn Lys Ile Val Thr Gly Glu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu	
40 45 50 55	
GTG GAT TGT GAT ACA GGA TAT AAC GAA GGA TGC AAT GGA GGA CTT ATG	673
Val Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Asn Glu Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met	
60 65 70	
GAC TAT GCA TTT GAG TTC ATT ATC AAC AAT GGC GGC ATT GAT TCT GAA	721
Asp Tyr Ala Phe Glu Phe Ile Ile Asn Asn Gly Gly Ile Asp Ser Glu	
75 80 85	

1 9

GAG GAT TAC CCT TAC CGT GGT GTT GAT GGT AGA TGT GAC ACA TAT AGG 769
 Glu Asp Tyr Pro Tyr Arg Gly Val Asp Gly Arg Cys Asp Thr Tyr Arg
 90 95 100
 AAA AAT GCT AAG GTT GTT TCT ATT GAT GAC TAC GAA GAT GTT CCT GCC 817
 Lys Asn Ala Lys Val Val Ser Ile Asp Asp Tyr Glu Asp Val Pro Ala
 105 110 115
 TAT GAT GAG TTA GCT TTG AAA AAG GCT GTT GCA AAT CAG CCC GTC AGT 865
 Tyr Asp Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ala Val Ala Asn Gln Pro Val Ser
 120 125 130 135
 GTA GCT ATT GAA GGA GGG GGC AGG GAA TTT CAA TTA TAT GTA TCT GGT 913
 Val Ala Ile Glu Gly Gly Gly Arg Glu Phe Gln Leu Tyr Val Ser Gly
 140 145 150
 GTA TTC ACT GGG AGA TGT GGC ACA GCA CTA GAT CAT GGT GTC GTG GCT 961
 Val Phe Thr Gly Arg Cys Gly Thr Ala Leu Asp His Gly Val Val Ala
 155 160 165
 GTT GGG TAT GGT ACA GCT AAT GGT CAT GAT TAT TGG ATC GTA AGG AAT 1009
 Val Gly Tyr Gly Thr Ala Asn Gly His Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn
 170 175 180
 TCA TGG GGT CCT AGC TGG GGA GAA GAT GGC TAC ATC AGG TTA GAA AGA 1057
 Ser Trp Gly Pro Ser Trp Gly Glu Asp Gly Tyr Ile Arg Leu Glu Arg
 185 190 195
 AAT CTT GCT AAC AGC AGA TCA GGC AAG TGT GGA ATT GCA ATT GAG CCA 1105
 Asn Leu Ala Asn Ser Arg Ser Gly Lys Cys Gly Ile Ala Ile Glu Pro
 200 205 210 215
 TCT TAT CCC CTT AAG AAT GGT CCA AAT CCA CCT AAT CCT GGA CCA TCA 1153
 Ser Tyr Pro Leu Lys Asn Gly Pro Asn Pro Pro Asn Pro Gly Pro Ser
 220 225 230
 CCC CCT TCA CCT GTG AAG CCA CCA AAT GTC TGT GAC AAC TAC TAC AGC 1201
 Pro Pro Ser Pro Val Lys Pro Pro Asn Val Cys Asp Asn Tyr Tyr Ser
 235 240 245
 TGT GCT GAT AGT GCT ACT TGT TGC TGT ATT TTC GAG TTC GGA AAT GCT 1249
 Cys Ala Asp Ser Ala Thr Cys Cys Cys Ile Phe Glu Phe Gly Asn Ala
 250 255 260
 TGC TTT GAG TGG GGT TGC TGT CCT CTT GAG GGT GCT ACC TGC TGT GAT 1297
 Cys Phe Glu Trp Gly Cys Cys Pro Leu Glu Gly Ala Thr Cys Cys Asp
 265 270 275
 GAC CAC TAC AGT TGC TGC CCT AAC GAC TAT CCC ATC TGC AAC ACT TAT 1345
 Asp His Tyr Ser Cys Cys Pro Asn Asp Tyr Pro Ile Cys Asn Thr Tyr
 280 285 290 295
 GCT GGA ACT TGT CTC AGG AGC AAG AAC AAC CCA TTC GGA GTG AAG GCA 1393
 Ala Gly Thr Cys Leu Arg Ser Lys Asn Asn Pro Phe Gly Val Lys Ala
 300 305 310
 TTG AGG CGT ACT CCG GCT AAA CCC CAT TGG ACC TTT GGG CGT AAG AAC 1441
 Leu Arg Arg Thr Pro Ala Lys Pro His Trp Thr Phe Gly Arg Lys Asn
 315 320 325
 AAG GTC AGC AGT GCT TAAGCAGATA AAGGAAATGT GAACGTGCAG GAAGGAGCCA 1496
 Lys Val Ser Ser Ala
 330

ATGATGAAGT AAATGAAAGA CGAAGAATTA AACACCAGC TGATACACTT CCCCTTTACC 1556
 TTCACATAAA TTTCTCTGTG CCATTTTATT ATGATACAAA TTGATACTAT TCTGTATCAA 1616

21

22

ATTCAGTCA GATATTGGCT GTGTACATAG GGTATATTA TTGATGCACT GTATTGTAT 1676
 TCAAATTCCA ATTCCAAATG GCGAACATAT TTGATTGCTG TTAGTTTCCC AGTTATGTA 1736
 GACTATGTGA CAATGCAGCA TTATTGGAT TTGCCCCGATA TTCTGGCTAT TTCATTGCT 1796
 TAAAAAAAAA A 1807

【0098】配列番号：2

* 起源

配列の長さ：1849

生物名：Glycine max

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：二本鎖

特徴を表わす記号：CDS

トポロジー：直鎖状

存在位置：48..1442

配列の種類：cDNA to mRNA

* 10 特徴を決定した方法：P

配列：

TAAACATCTC AATGGGTCTC TCTTCTATTA CAACATCGCC CGCAACC 47
 ATG ACC ATG GCT GCG ATC GTG CTC CTG TTC ACG GTC TTT GCC GTT TCC 95
 Met Thr Met Ala Ala Ile Val Leu Leu Phe Thr Val Phe Ala Val Ser
 -130 -125 -120
 TCC GCC CTA GAC ATG TCG ATA ATC TCG TAC GAC AGC GCC CAC GCG GAC 143
 Ser Ala Leu Asp Met Ser Ile Ile Ser Tyr Asp Ser Ala His Ala Asp
 -115 -110 -105
 AAG GCC GCC ACG TTG CGC ACC GAG GAG GAG CTG ATG TCC ATG TAC GAG 191
 Lys Ala Ala Thr Leu Arg Thr Glu Glu Glu Leu Met Ser Met Tyr Glu
 -100 -95 -90 -85
 CAG TGG CTC GTG AAG CAC GGG AAG GTG TAC AAC GCG CTC GGC GAG AAG 239
 Gln Trp Leu Val Lys His Gly Lys Val Tyr Asn Ala Leu Gly Glu Lys
 -80 -75 -70
 GAG AAG CGC TTC CAG ATC TTC AAG GAC AAC CTG CGA TTC ATC GAC GAC 287
 Glu Lys Arg Phe Gln Ile Phe Lys Asp Asn Leu Arg Phe Ile Asp Asp
 -65 -60 -55
 CAC AAC TCC GCG GAG GAC CGA ACC TAC AAG CTC GGA CTG AAC CGG TTC 335
 His Asn Ser Ala Glu Asp Arg Thr Tyr Lys Leu Gly Leu Asn Arg Phe
 -50 -45 -40
 GCT GAT CTC ACC AAC GAG GAA TAC AGG GCC AAG TAC TTG GGA ACC AAG 383
 Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ala Lys Tyr Leu Gly Thr Lys
 -35 -30 -25
 ATC GAT CCC AAC CGG AGG CTC GGA AAG ACC CCG AGC AAC CGC TAC GCG 431
 Ile Asp Pro Asn Arg Arg Leu Gly Lys Thr Pro Ser Asn Arg Tyr Ala
 -20 -15 -10 -5
 CCA CGT GTC GGC GAC AAA TTG CCT GAT TCC GTT GAT TGG AGG AAG GAA 479
 Pro Arg Val Gly Asp Lys Leu Pro Asp Ser Val Asp Trp Arg Lys Glu
 1 5 10
 GGT GCT GTT CCT CCT GTC AAA GAC CAA GGA GGC TGT GGG AGC TGT TGG 527
 Gly Ala Val Pro Pro Val Lys Asp Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp
 15 20 25
 GCA TTC TCA GCA ATC GGT GCA GTA GAA GGA ATA AAT AAG ATA GTA ACA 575
 Ala Phe Ser Ala Ile Gly Ala Val Glu Gly Ile Asn Lys Ile Val Thr
 30 35 40
 GGC GAA CTG ATT TCG TTA TCA GAA CAA GAA TTG GTG GAT TGT GAT ACT 623
 Gly Glu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr
 45 50 55 60
 GGA TAT AAC CAA GGA TGC AAT GGA GGA CTT ATG GAC TAT GCA TTT GAG 671
 Gly Tyr Asn Gln Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Asp Tyr Ala Phe Glu

23	65	70	75	
TTC ATA ATC AAC AAT GGC GGC ATT GAT TCT GAT GAG GAT TAC CCA TAC	719			
Phe Ile Ile Asn Asn Gly Gly Ile Asp Ser Asp Glu Asp Tyr Pro Tyr				
80	85	90		
CGT GGT GTT GAT GGT AGA TGC GAC ACA TAT AGG AAA AAT GCT AAA GTC	767			
Arg Gly Val Asp Gly Arg Cys Asp Thr Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Val				
95	100	105		
GTT TCT ATT GAT GAC TAC GAA GAT GTT CCT GCC TAT GAT GAG TTA GCC	815			
Val Ser Ile Asp Asp Tyr Glu Asp Val Pro Ala Tyr Asp Glu Leu Ala				
110	115	120		
TTG AAA AAG GCC GTT GCA AAT CAG CCC GTG AGC GTT GCT ATT GAA GGA	863			
Leu Lys Lys Ala Val Ala Asn Gln Pro Val Ser Val Ala Ile Glu Gly				
125	130	135	140	
GGG GGC AGG GAA TTT CAA TTA TAT GTA TCT GGT GTA TTC ACG GGG AGA	911			
Gly Gly Arg Glu Phe Gln Leu Tyr Val Ser Gly Val Phe Thr Gly Arg				
145	150	155		
TGT GGC ACA GCA CTA GAT CAT GGT GTC GTG GCT GTT GGG TAT GGA ACA	959			
Cys Gly Thr Ala Leu Asp His Gly Val Val Ala Val Gly Tyr Gly Thr				
160	165	170		
GCT AAA GGT CAT GAT TAT TGG ATC GTA AGG AAT TCA TGG GGT TCT AGC	1007			
Ala Lys Gly His Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Gly Ser Ser				
175	180	185		
TGG GGA GAG GAT GGC TAC ATC AGA TTA GAA AGA AAT CTT GCT AAC AGC	1055			
Trp Gly Glu Asp Gly Tyr Ile Arg Leu Glu Arg Asn Leu Ala Asn Ser				
190	195	200		
AGA TCA GGC AAG TGT GGA ATT GCA ATT GAG CCA TCT TAT CCC CTT AAG	1103			
Arg Ser Gly Lys Cys Gly Ile Ala Ile Glu Pro Ser Tyr Pro Leu Lys				
205	210	215	220	
AAT GGT CCA AAT CCC CCT AAT CCT GGA CCA TCA CCC CCT TCA CCT GTG	1151			
Asn Gly Pro Asn Pro Pro Asn Pro Gly Pro Ser Pro Pro Ser Pro Val				
225	230	235		
AAG CCG CCA AAT GTC TGT GAC AAC TAC TAC AGC TGT GCT GAT AGT GCT	1199			
Lys Pro Pro Asn Val Cys Asp Asn Tyr Tyr Ser Cys Ala Asp Ser Ala				
240	245	250		
ACT TGT TGC TGT ATT TTT GAG TTC GGA AAT GCT TGC TTC GAG TGG GGT	1247			
Thr Cys Cys Cys Ile Phe Glu Phe Gly Asn Ala Cys Phe Glu Trp Gly				
255	260	265		
TGC TGT CCT CTT GAG GGT GCT TCC TGC TGT GAT GAC CAC TAC AGT TGC	1295			
Cys Cys Pro Leu Glu Gly Ala Ser Cys Cys Asp Asp His Tyr Ser Cys				
270	275	280		
TGC CCT GCA GAC TAT CCC ATC TGC AAC ACT TAC GCT GGA ACT TGT CTC	1343			
Cys Pro Ala Asp Tyr Pro Ile Cys Asn Thr Tyr Ala Gly Thr Cys Leu				
285	290	295	300	
AGG AGC AAG AAC AAC CCC TTT GGA GTG AAG GCA TTA AGG CGT ACT CCA	1391			
Arg Ser Lys Asn Asn Pro Phe Gly Val Lys Ala Leu Arg Arg Thr Pro				
305	310	315		
GCG AAA CCC CAT TGG ACC TTC GGA CGT AAG AAC AAG GTC AGC AGT GCT	1439			
Ala Lys Pro His Trp Thr Phe Gly Arg Lys Asn Lys Val Ser Ser Ala				
320	325	330		
TAAGCAGTTT AAGGAAATGT GAACGTGCAG AAGGAGCCAA TGATGAAGTA AAAGGAAGA	1499			

25

26

CGAAGGACTA AAGCACCAGC TGGATGCACT TCCCCCTTCT TCACATAATG CTGCACGTAA 1559
 CATAAAGATC TTTACCATT TATTATGATA CAAAATAGAT AATGTTCTGT ATCAAATTC 1619
 AGTCAGACAT TGGCTCTGTA CATAGGGTTA TATTATCGAT GCACTGTATT TGTATTCAAA 1679
 TTCCAAATGG CGAACATATT TGATTGCTGT TAGTTTTCAA GGTTCTGTAG ATTATGTGAC 1739
 AATGCAGCAG CAATATTTGG ATTTGTCCCA TATTCACATG CTATTTTAAT TTGCTTACAA 1799
 TGTGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1849

【0099】配列番号：3

* 配列の特徴

配列の長さ：1056

特徴を表わす記号：CDS

配列の型：核酸

存在位置：1..1056

鎖の数：二本鎖

10 特徴を決定した方法：P

トポロジー：直鎖状

特徴を表わす記号：insertion seq

配列の種類：cDNA to mRNA

存在位置：1..9

起源

特徴を決定した方法：E

生物名：Glycine max

*

配列：

ATG GCT AGG TAC GAC AGC GCC CAC GCG GAC AAG GCC GCC ACG TTG CGC 48
 Met Ala Arg Tyr Asp Ser Ala His Ala Asp Lys Ala Ala Thr Leu Arg
 5 10 15
 ACC GAG GAG GAG CTG ATG TCC ATG TAC GAG CAG TGG CTC GTG AAG CAC 96
 Thr Glu Glu Glu Leu Met Ser Met Tyr Glu Gln Trp Leu Val Lys His
 20 25 30
 GGG AAG GTG TAC AAC GCG CTC GGC GAG AAG GAG AAG CGC TTC CAG ATC 144
 Gly Lys Val Tyr Asn Ala Leu Gly Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Ile
 35 40 45
 TTC AAG GAC AAC CTG CGA TTC ATC GAC GAC CAC AAC TCC GCG GAG GAC 192
 Phe Lys Asp Asn Leu Arg Phe Ile Asp Asp His Asn Ser Ala Glu Asp
 50 55 60
 CGA ACC TAC AAG CTC GGA CTG AAC CGG TTC GCT GAT CTC ACC AAC GAG 240
 Arg Thr Tyr Lys Leu Gly Leu Asn Arg Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu
 65 70 75 80
 GAA TAC AGG GCC AAG TAC TTG GGA ACC AAG ATC GAT CCC AAC CGG AGG 288
 Glu Tyr Arg Ala Lys Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Asp Pro Asn Arg Arg
 85 90 95
 CTC GGA AAG ACC CCG AGC AAC CGC TAC GCG CCA CGT GTC GGC GAC AAA 336
 Leu Gly Lys Thr Pro Ser Asn Arg Tyr Ala Pro Arg Val Gly Asp Lys
 100 105 110
 TTG CCT GAT TCC GTT GAT TGG AGG AAG GAA GGT GCT GTT CCT CCT GTC 384
 Leu Pro Asp Ser Val Asp Trp Arg Lys Glu Gly Ala Val Pro Pro Val
 115 120 125
 AAA GAC CAA GGA GGC TGT GGG AGC TGT TGG GCA TTC TCA GCA ATC GGT 432
 Lys Asp Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Ile Gly
 130 135 140
 GCA GTA GAA GGA ATA AAT AAG ATA GTA ACA GGC GAA CTG ATT TCG TTA 480
 Ala Val Glu Gly Ile Asn Lys Ile Val Thr Gly Glu Leu Ile Ser Leu
 145 150 155 160
 TCA GAA CAA GAA TTG GTG GAT TGT GAT ACT GGA TAT AAC CAA GGA TGC 528
 Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Gly Cys
 165 170 175
 AAT GGA GGA CTT ATG GAC TAT GCA TTT GAG TTC ATA ATC AAC AAT GGC 576
 Asn Gly Gly Leu Met Asp Tyr Ala Phe Glu Phe Ile Ile Asn Asn Gly

27	180	185	190	28
GGC ATT GAT TCT GAT GAG GAT TAC CCA TAC CGT GGT GTT GAT GGT AGA				624
Gly Ile Asp Ser Asp Glu Asp Tyr Pro Tyr Arg Gly Val Asp Gly Arg				
195	200	205		
TGC GAC ACA TAT AGG AAA AAT GCT AAA GTC GTT TCT ATT GAT GAC TAC				672
Cys Asp Thr Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Val Val Ser Ile Asp Asp Tyr				
210	215	220		
GAA GAT GTT CCT GCC TAT GAT GAG TTA GCC TTG AAA AAG GCC GTT GCA				720
Glu Asp Val Pro Ala Tyr Asp Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ala Val Ala				
225	230	235	240	
AAT CAG CCC GTG AGC GTT GCT ATT GAA GGA GGG GGC AGG GAA TTT CAA				768
Asn Gln Pro Val Ser Val Ala Ile Glu Gly Gly Gly Arg Glu Phe Gln				
245	250	255		
TTA TAT GTA TCT GGT GTA TTC ACG GGG AGA TGT GGC ACA GCA CTA GAT				816
Leu Tyr Val Ser Gly Val Phe Thr Gly Arg Cys Gly Thr Ala Leu Asp				
260	265	270		
CAT GGT GTC GTG GCT GTT GGG TAT GGA ACA GCT AAA GGT CAT GAT TAT				864
His Gly Val Val Ala Val Gly Tyr Gly Thr Ala Lys Gly His Asp Tyr				
275	280	285		
TGG ATC GTA AGG AAT TCA TGG GGT TCT AGC TGG GGA GAG GAT GGC TAC				912
Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Gly Ser Ser Trp Gly Glu Asp Gly Tyr				
290	295	300		
ATC AGA TTA GAA AGA AAT CTT GCT AAC AGC AGA TCA GGC AAG TGT GGA				960
Ile Arg Leu Glu Arg Asn Leu Ala Asn Ser Arg Ser Gly Lys Cys Gly				
305	310	315	320	
ATT GCA ATT GAG CCA TCT TAT CCC CTT AAG AAT GGT CCA AAT CCC CCT				1008
Ile Ala Ile Glu Pro Ser Tyr Pro Leu Lys Asn Gly Pro Asn Pro Pro				
325	330	335		
AAT CCT GGA CCA TCA CCC CCT TCA CCT GTG AAG CCG CCA AAT GTC TGA				1056
Asn Pro Gly Pro Ser Pro Pro Ser Pro Val Lys Pro Pro Asn Val				
340	345	350		

【図面の簡単な説明】

【図1】発現プラスミドpGEMpβの構築過程（部分）を示す部分図である。

【図2】発現プラスミドpGEMpβの構築過程（部分）を示す部分図である。

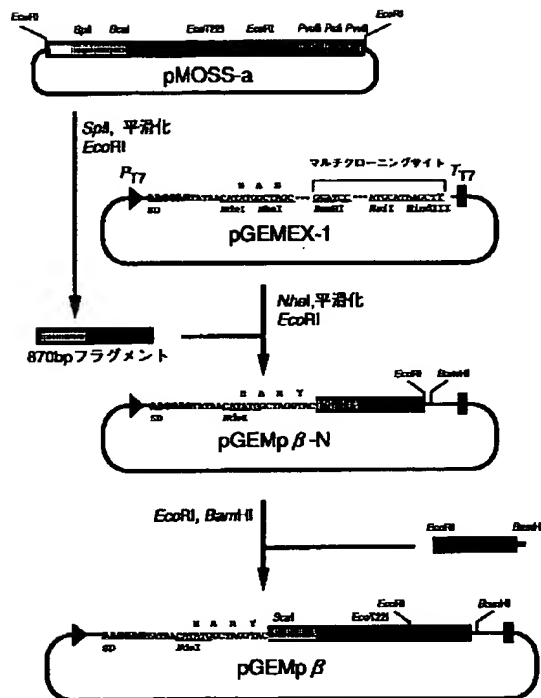
【図3】分泌発現プラスミドpYESD3(ΔTer o)の構築過程（部分）を示す部分図である。

*【図4】分泌発現プラスミドpYESD3(ΔTer o)の構築過程（部分）を示す部分図である。

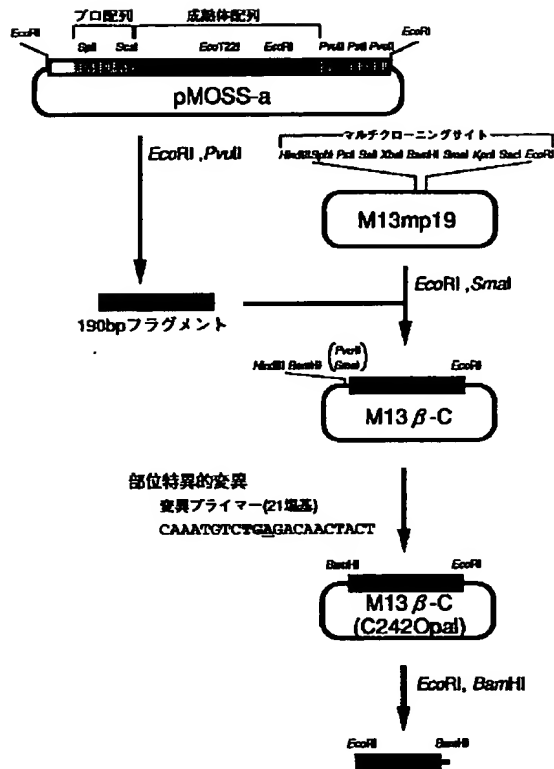
【図5】ベクターpYES2、および発現プラスミドpYESD3(ΔTer o)を保持する形質転換体である酵母INVSC1株を培養した培地のSDS-PAGE像を示す図である。

*

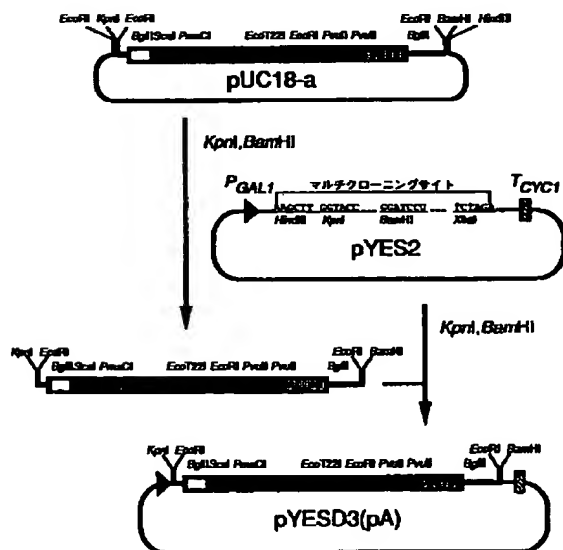
【図1】



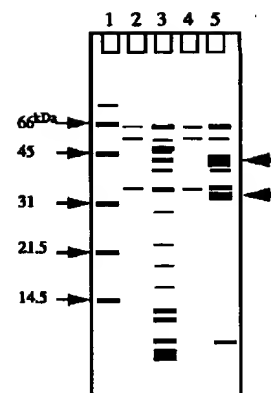
【図2】



【図3】



【図5】



WEST



Generate Collection

Print

L5: Entry 3 of 10

File: JPAB

May 13, 1997

PUB-NO: JP409121870A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 09121870 A

TITLE: DNA CAPABLE OF CODING NEW THIOL PROTEASE AND PRODUCTION OF THE SAME THIOL PROTEASE USING THE DNA

PUBN-DATE: May 13, 1997

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

KAWAI, MISAOKO

ASANO, MINAO

SUZUKI, SHUNICHI

MIWA, TETSUYA

SHIBAI, HIROSHIRO

YOKOZEKI, KENZO

INT-CL (IPC): C12 N 15/09; C12 N 1/19; C12 N 1/21; C12 N 9/50

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new DNA, having a specific base sequence and capable of coding a new thiol protease derived from a germinated soybean cotyledon and mass-producing an enzyme capable of efficiently hydrolyzing a soybean protein with a high efficiency according to a gene recombination method.

SOLUTION: This new DNA has a base sequence represented by formula I or II and is capable of coding a new thiol protease derived from a germinated soybean cotyledon and directly mass-producing the new thiol protease capable of efficiently hydrolyzing a soybean protein into amino acids or low-molecular peptides with a high efficiency according to a gene recombination method. The new DNA is obtained by extracting an RNA from the soybean cotyledon on the 10th day after seeding according to a conventional method, then separating an mRNA from the RNA, carrying out the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with a primer comprising a synthetic oligonucleotide, performing the reverse transcription, amplification and cloning.

COPYRIGHT: (C) 1997, JPO

Mon Jan 13 10:27:28 2003

08-60-us

RESULT 7					
E13051	E13051	1807 bp	DNA		
LOCUS			linear		PAT 27-APR-1998
DEFINITION	cDNA encoding thiol protease D3-alpha.				
ACCESSION	E13051				
VERSION	E13051.1	GI:3251863			
KEYWORDS	JP 1997121870-A/1.				
SOURCE	Glycine max.				
ORGANISM	Glycine max. [Glycine max.], Strontophyta; Embryophyta; Tracheophyta;				

